

AB

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-277038

(43) 公開日 平成6年(1994)10月4日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 3/00	A			
C 1 2 N 11/10				

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平5-97290	(71) 出願人	000138277 株式会社ヤトロン 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
(22) 出願日	平成5年(1993)3月31日	(72) 発明者	阿部 康次 長野県上田市古里1928-29
特許法第30条第1項適用申請有り 1992年10月1日 社 団法人高分子学会発行の「高分子 Vol. 41」に発表		(72) 発明者	寺本 彰 長野県上田市踏入2-16-27
		(72) 発明者	田中 満直 東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株 式会社ヤトロン内
		(74) 代理人	弁理士 森田 憲一

(54) 【発明の名称】 細胞培養基材

(57) 【要約】

【目的】 高分子電解質錯体 (P E C) からなる細胞培養基材を提供する。

【構成】 少なくとも表面が、カチオン性高分子電解質としてのキトサンとアニオン性高分子電解質としてのセルロース誘導体とのP E Cにより形成される。

【効果】 培養対象細胞の性質に応じて、キトサンとセルロース誘導体との組合せや配合比を適宜選択して、適切な物性を有する培養基材を容易に提供することができる。生体成分を用いる従来法と比較して、製品間の均一性欠如、劣化、ゲル製造の煩雑さ等の問題がなく、しかも安価である。更に、培養細胞が脱分化して機能を失うことのない、機能培養が可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも表面が、カチオン性高分子電解質としてのキトサンとアニオン性高分子電解質としてのセルロース誘導体とからなる高分子電解質錯体により形成されていることを特徴とする、細胞培養基材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、少なくとも表面が、カチオン性高分子電解質であるキトサンとアニオン性高分子電解質であるセルロース誘導体とからなる高分子電解質錯体により形成されている細胞培養基材に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、動物細胞を培養し、その細胞からワクチンやインターフェロン等の生理活性物質を生産する研究や、人工臓器等のバイオテクノロジー分野の急速な発展に伴い、生体内 (in vivo) の細胞が有する機能を生体外 (in vitro) で培養した細胞に発現させるための研究等、細胞培養に関する研究は盛んに行われている。従来の細胞培養法には多くの種類があるが、ガラスや合成高分子樹脂からなる担体、例えばシャーレ等の表面に細胞を付着させ、増殖と共に単層を形成させる単層培養法が主体である。

【0003】 接着性動物細胞を増殖させるためには、基材表面と細胞の接着性が良好であることと共に、接着した細胞の形態、配列が、細胞の伸展、増殖に有効な形態となっていることが必要である。そこで、基材自体の表面を親水化することで種々改良が試みられてきた (特開昭52-41291号公報、特開昭57-22691号公報)。しかし、これらの基材を用いても本来生体内で有していた細胞機能を維持することは不十分であり、細胞は生存・増殖はするものの急速に脱分化して機能を失う場合がほとんどである。このような機能の消失を防ぐために、組織を生体外で再構築することにより、細胞機能の発現を試みようとする機能培養が模索されている。即ち、in vitro の培養用基材として細胞外マトリックスを用い、細胞に組織構築を行わせようとするものである。例えば浮遊コラーゲンゲルを基材として用いる肝実質細胞の培養 [Exp. Cell Res., 94, 70 (1975)] や、コラーゲン合成のコファクターであるL-アスコルビン酸2-リン酸を培養系に添加し、細胞のコラーゲン合成を活性化させ、三次元的に培養する [生化, 60, 201 (1988)] ことも検討されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、コラーゲン自体が生体成分であるために高価であり、また製品の均一性欠如、劣化、ゲル製造の煩雑さ等に多くの問題点を有している。従って、本発明の目的は、完全な人工合成材料からなり、機能培養に適した基材を提供することにある。

【0005】

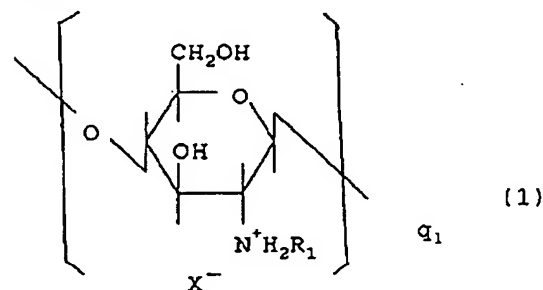
【課題を解決するための手段】 前記の目的は、本発明により少なくとも表面が、カチオン性高分子電解質としてのキトサンとアニオン性高分子電解質としてのセルロース誘導体とからなる高分子電解質錯体により形成されていることを特徴とする、細胞培養基材によって達成することができる。

【0006】 以下、発明を詳細に説明する。本発明に用いられる高分子電解質錯体 (polyelectrolyte complex: 以下、PECともいう) は、それ自体公知の物質である。PECは正荷電を有する高分子電解質であるカチオンポリマーの溶液と負荷電を有する高分子電解質であるアニオンポリマーの溶液とを混合することにより瞬時に形成することができる。こうして得られたPECは、特殊な3元系溶媒 (例えば、特定の組成からなる、水/アセトン/低分子塩) には溶解するが、一般的な溶媒には不溶性である。PECは、出発ポリマー (高分子電解質) の種類、それらの混合比、調製条件などにより、多様な性質を有する各種の高分子電解質錯体を提供することができる。

【0007】 本発明では、カチオンポリマーとして下記構造式 (1) のキトサンを用いる。周知のとおり、キトサンは、キチン (β -ポリ-N-アセチル-D-グルコサミン) を脱アセチル化して得られる生成物で、 β -ポリ-D-グルコサミンである。式 (1) 中、 R_1 は水素原子又はアセチル基であり、 X_1^- 対イオンであり、脱アセチル化度は50~100% (好ましくは70~100%)、 q_1 は10~3000 (好ましくは10~2000) である。

【0008】

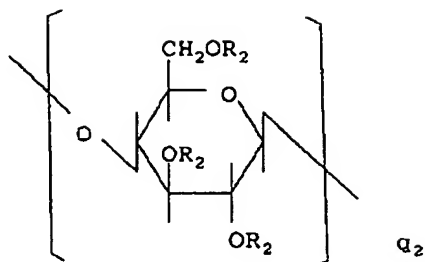
【化1】



【0009】 本発明では、アニオンポリマーとして下記構造式 (2) のセルロース誘導体を用いる。式 (2) 中、 R_2 は水素原子、カルボキシメチル基、硫酸基又はリン酸基であり、 q_2 は10~15000 (好ましくは20~5000) である。

【0010】

【化2】



(2)

【0011】上記のカチオンポリマーとしてのキトサンとアニオンポリマーとしてのセルロース誘導体とを通常の方法で反応させると、前記式(1)中の $-N^+H_2R$ の N^+ 原子と、前記式(2)中の $COOH$ 基、 SO_3H 基及び/又は PO_3H 基の少なくとも一部とが反応して、容易にPECを調製することができる。即ち、前記のキトサン及びセルロース誘導体の各水溶液(10^{-5} モル/リットル $\sim 10^{-2}$ モル/リットル)を、カチオンポリマーのカチオン席とアニオンポリマーのアニオン席との濃度比(カチオン席/アニオン席)が0.25 \sim 4.0の範囲内、好ましくは0.4 \sim 2.5の範囲内で、水溶液中で混合して反応させれば良い。カチオン席とアニオン席の濃度比が0.25 \sim 4.0の範囲外になると、PECが形成され難くなるので好ましくない。各ポリマーを溶解する溶媒としては、精製水や各種緩衝液(例えばリン酸緩衝液等)、あるいはそれらと水混和性有機溶媒(例えばメタノール、エタノール、アセトン等)との混合液を用いることができる。この反応は比較的高い活性があるので、溶液のpH、イオン強度、温度などは比較的広い範囲であることができるが、一般的にはpH3 \sim 9、イオン強度0 \sim 1.0及び20 \sim 60 $^{\circ}C$ で実施する。こうして得られる高分子電解質錯体を直接細胞培養基材として形成するか、あるいは従来の適当な材料に被覆することによって、細胞培養基材として用いることができる。

【0012】本発明においては、キトサンとセルロース誘導体との組合せや配合比を変化させることにより、生成するPECの荷電バランスを容易に変更し、調整することができる。即ち、種々の荷電バランスを有するPECを用いることで、細胞培養基材の表面電荷を調整し、その使用条件に従って表面特性を適宜選択することが可能となる。本発明で用いるPECの荷電バランスは、 $-6 \sim +6$ の範囲で選択し得る。ここで、荷電バランスとは、PECの荷電状態を、その出発原料であるカチオンポリマー及びアニオンポリマーの、各々のカチオン席及びアニオン席の濃度比で表現するものである。例えば、使用するカチオンポリマーのカチオン席及びアニオンポリマーのアニオン席の濃度比が等しい場合は、生成するPECの荷電バランスは ± 0 となる。濃度比がこれより

大きければ(即ち、カチオン席の濃度の方が高ければ)荷電バランスはプラスとなり、小さければ(即ち、アニオン席の方が高ければ)マイナスとなる。また、濃度比が1.5の場合は荷電バランスは $+2$ となり、濃度比が0.5の場合は荷電バランスは -3 となる。荷電バランスの調整は、等濃度のカチオンポリマー溶液及びアニオンポリマー溶液の混合量を変化させることによって容易に行うことができる。

【0013】PECの調製時における溶液のpH、塩濃度、水混和性有機溶媒の含有量を変化させることにより、生成PECの物性(例えば、硬度や弾性)を自由に調整することが可能で、粒子状、板状又はフィルム状等への成型も容易に行えるので、PECそれ自体から本発明の細胞培養基材を形成することができる。また、PECは種々の材料に簡便且つ容易に被覆できるので、適当な担体や従来の基材に、PECを被覆して本発明の細胞培養基材を形成することもできる。更に、PECそれ自体からなる部分と、適当な担体や従来の基材にPECを被覆した部分とから形成してもよい。

【0014】PECを被覆することのできる担体又は従来の細胞培養基材としては、既に適当な材質(ガラス、セルロース、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリル酸、ポリスチレン、ポリエステル、ポリイソブレン、ポリプロピレン、ポリアミド等の合成高分子樹脂、綿、紙等の天然高分子、キュプロファン、レーヨン等の再生樹脂、金属、セラミックス等)で加工されたシャーレ、プレート、培養容器、培養バッグ、フィルム、繊維、マイクロキャリア、ビーズ等が挙げられる。従来の細胞培養基材は、既に形状やサイズ、多孔質の孔径等が管理されているので、単にPECをコートするだけで、種々の規格が管理された本発明による細胞培養基材を簡便に製造することができる。

【0015】PECを担体又は従来の基材に被覆させるには、例えば、塗布、噴霧又は浸漬などの方法で行うことができる。PEC溶液を担体に単に接触させるだけでも良い。例えば、キトサン溶液とセルロース誘導体溶液とを混合し、その溶液と担体又は従来の基材とを0.5 \sim 48時間程度接触させておき、そうして処理した担体又は従来の基材を生理食塩水や精製水で洗浄した後、室温で風乾あるいは50 \sim 100 $^{\circ}C$ 程度に加温して乾燥する。このとき、例えばNaCl等の塩を0.01 \sim 5M、温度を0 \sim 100 $^{\circ}C$ の雰囲気範囲でPECを生成させ、担体又は従来の基材と接触又は浸漬させることにより、PECの被覆処理時間を短縮(例えば温度を高めることによる)し、温和な条件下でPECを被覆することもできる。

【0016】こうして調製したキトサン-セルロース高分子電解質錯体からなる本発明の細胞培養基材を用いて培養することのできる細胞は、従来の細胞培養基材で培養されているものと特に異なるものではなく、上皮細胞

や繊維芽細胞等の所謂接着性動物細胞全般である。また、本発明の細胞培養基材を用いる培養方法も従来の培養方法と特に異なるものではなく、培養規模や培養の目的等に応じて、従来公知の培養法を適用することができる。

【0017】

【作用】本発明と同様のPECを利用した細胞培養基材が、特開昭63-79587号公報に開示されている。しかし、この公報記載のPECは4級化ポリエチレンイミンをカチオンポリマーとして用いるのに対し、本発明による細胞培養基材のPECは、かさ高い環構造を主鎖に含む多糖類をカチオンポリマーとして用いる。従って、本発明のPECは、前記公報記載のPECと比較して、内部回転の拘束性が高くなるに高く、解離基の立体的配置の自由度が少ないため、規則的な梯子状(ladder)構造を呈するPECを形成しやすく、構成成分や全体構造がかなり異なるので、培養基材としての物性も異なるものとなる。すなわち、細胞と基材の接着は、血清に含まれる接着因子による作用以外にも、静電的な結合力を介して相互作用する。このため、基材表面の親水性・疎水性、表面エネルギー、マイクロドメイン構造などが深く関与していることが考えられる。

【0018】多糖類のPECの場合には、前記公報などに記載のその他のPECが有する特性以外の特性を有することが容易に考えられる。例えば、解離基の種類、密度や位置により、PEC全体としては理論的に中性であっても、イオン結合に関与しないフリーの解離基が生じ、細胞の接着性や増殖性に何らかの影響を与えたり、PEC自体が細胞の増殖に因子的機能を有する可能性等、従来には予測し得なかった機能を発現させているものと考えられる。更に、PECはハイドロゲルとしても機能しているので、物理的な表面の運動性、排除体積効果なども関与していることが考えられる。このような幾つかの要因があいまって従来に無い、極めて好適な細胞培養基材としての機能を発現しているものと思われる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、以下の実施例に記載の平均分子量は蒸気圧降下法で測定した数平均分子量である。以下の実施例において使用したポリマー及びその略称を以下に示す。

(1) カチオンポリマー (キトサン)

CS:キトサン(脱アセチル化度100%;平均分子量約5000)

(2) アニオンポリマー (セルロース誘導体)

CCEL:カルボキシメチルセルロース(1ピラノース酸基当たりの官能基導入率0.9;平均分子量約18000)

PCEL:リン酸化セルロース(1ピラノース酸基当たりの官能基導入率0.5;平均分子量約160000)

SCEL:硫酸化セルロース(1ピラノース酸基当たりの官能基導入率0.8;平均分子量約120000)

【0020】実施例1:PECコーティングディッシュの調製

カチオンポリマーであるCSを1.62mg/mlの濃度(イオン席として 10^{-2} M;以下 10^{-2} UMともいう)となるように1%酢酸溶液(pH6.0)を用いて調製し、CS溶液とした。アニオンポリマーであるCCELを2.14mg/mlの濃度(10^{-2} UM)となるよう蒸留水(pH7.0)を用いて調製し、CCEL溶液とした。これらの溶液を等量ずつ混合しPECを形成させ、直ちにこのPEC溶液1mlを細胞培養用ディッシュ(NUNCION DELTA)に注入し、室温で一晩静置した後、上清を除去し、次いで65℃で一晩乾燥した。乾燥後、蒸留水1mlを注入してディッシュを洗浄し、再度65℃で乾燥させて、PECコーティングディッシュを得た。上記のCCELに換えてPCEL及びSCELを用いて同様の操作を行い、CS-PCEL及びCS-SCELコーティングディッシュをそれぞれ調製した。対照としてPEC未コートディッシュを用い、以下の試験を行った。

【0021】実施例2:細胞接着性の評価

細胞として歯周靭帯由来の歯根膜細胞(以下、HPLFという)を用い、培養液はDulbecco's Modified Eagle's Medium(以下、DMEMという)に牛胎児血清(以下、FBSという)10%を加えた培養液を用いた。この培養液を用いてHPLF細胞懸濁液(8×10^4 cell/s/ml)を調製した。この懸濁液1.5mlずつを実施例1で調製した各ディッシュに注入し(1.2×10^4 cell/s/dish)、5%CO₂及び37℃で24時間培養した。その後上澄み液を回収し、更に20mMリン酸緩衝液(pH7.4)1mlでディッシュをリンスすることにより、非接着細胞を完全に回収した。この非接着細胞を血球計算盤(ピルケルチュルク型)を用いて位相差顕微鏡下で計数し、接着率を求めた。結果を表1に示す。

【0022】実施例3:細胞増殖の評価

実施例2で用いた培養液を用いてHPLF細胞懸濁液(2.5×10^4 cells/ml)を調製した。この懸濁液2mlずつを実施例1で調製した各ディッシュに注入し(5×10^4 cells/dish)、5%CO₂及び37℃で4日間培養した。その後、浮遊細胞を上澄み液と共に取り除き、更に20mMリン酸緩衝液(pH7.4)1mlでディッシュをリンスした。0.02W/V%のEDTAと0.25W/V%のトリプシンを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4)1mlを注入し、37℃で10分間インキュベートした後、ピペッティングを行い、接着している細胞を剥離回収した。更に、ディッシュを20mMリン酸緩衝液(pH7.4)1mlでリンスして細胞を完全に回収した。この回収した細胞を実施例2と同様に血球計算盤を用いて計数した。結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

ディッシュ	接着性	増殖性	細胞形態
CS-CCEL	○	○	R、A
CS-PCEL	○	○	S
CS-SCEL	○	○	S
対照	○	△	S

【0024】表1中で、○は良好、△はやや不良、Rは丸いままの状態、Aは凝集形態、Sは伸展を示す。表1から明らかなように、本発明の細胞培養基材は、接着性について対照と同程度であるが、増殖性については対照よりも優れている。従って、PECコートディッシュを用いると、増殖率と長期間培養の点で、対照よりも優れている。また、細胞形態から判断して、特にCS-CCELコートディッシュを用いると、細胞が三次元的に増殖していることが確認できた。

【0025】

【発明の効果】本発明の細胞培養基材には、キトサンとセルロース誘導体とからなるPECを用いるので、培養対象細胞の性質に応じて、キトサンとセルロース誘導体との組合せや配合比を適宜選択して、適切な物性を有する培養基材を容易に提供することができる。また、生体成分を用いる場合と比較して、製品間の均一性欠如、劣化、ゲル製造の煩雑さ等の問題がなく、しかも安価である。更に、培養細胞が脱分化して機能を失うことのない、機能培養が可能になる。

CELL CULTURE MEDIUM

Patent number: JP6277038
Publication date: 1994-10-04
Inventor: ABE KOJI; others: 02
Applicant: IATRON LAB INC
Classification:
- **international:** C12M3/00; C12N11/10
- **european:**
Application number: JP19930097290 19930331
Priority number(s):

AB

[Report a data error here](#)**Abstract of JP6277038**

PURPOSE: To prepare a cell culture medium consisting of polymer electrolyte complex(PEC).

CONSTITUTION: This cell culture medium, at least its surface, is composed of chitosan as a cationic polymer electrolyte of the PEC and a cellulose derivative as an anionic polymer electrolyte. A cell culture medium having appropriate physical properties is easily obtained by properly selecting the combination and the compounding ratio of chitosan and the cellulose derivative depending on properties of an objective culture cell. Compared with the conventional medium using biological components, this medium is free from problems, e.g. lack of homogeneity among products, deterioration and complexity of gel production and economically obtainable. Further, this medium enables functional culture free from function loss caused by dedifferentiation of culture cells.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan